

Foto: Marcus A. K. Almança.



## ***Thermal Pest Control (TPC) III: Percepção do Fluxo de Ar Quente no Tecido Foliar da Videira e Impactos sobre o Metabolismo Antioxidativo, Membrana Celular e Fotossíntese***

Fábio Rossi Cavalcanti\*

### **Introdução**

O *Thermal Pest Control* (TPC) é um método de aplicação de fluxo de ar quente (FAQ) sobre estruturas arbustivas dispostas em linhas, geralmente em uma situação de agricultura extensiva. Esse método foi adaptado para uso em sistema mecanizado que, em sua forma mais conhecida, consiste de um implemento motorizado capaz de distribuir jatos de ar quente sobre o dossel vegetal (BARRA, 2011). No Brasil, equipamentos assim vêm sendo utilizados em vinhedos há alguns anos, com indicação principal para o controle de doenças da copa (Globo Rural, 2011). Atualmente, os equipamentos baseados em TPC desfrutam de um leque de qualidades amplamente divulgadas pela imprensa, a partir das patentes publicadas e opiniões de produtores e técnicos entrevistados, mostrando que os efeitos do FAQ poderiam trazer ganhos na qualidade de polinização, ganho de cor e peso em frutos, enrijecimento de casca e até a ativação de fenômenos associados à Resistência Sistêmica Adquirida (*System Acquired Resistance*, SAR) ou outro tipo de indução de resistência vegetal (IR) (FISHER; DAWSON, 2012).

Recentes estudos conduzidos pela Embrapa Uva e Vinho, no entanto, mostraram que o FAQ não fez produzir respostas biológicas esperadas para um agente de controle de doenças, sobre uma interação planta-patógeno do tipo *Plasmopara viticola* em videira: o míldio (MONTEIRO et al., 2014; CAVALCANTI et al., 2014). Tais repostas típicas envolveriam ou a inativação das estruturas do patógeno, ou a promoção de um evento de indução de resistência (IR), ou a remoção de inóculo da superfície de contato (WIDIASTUTI et al., 2011), ou um somatório desses efeitos. Nesses estudos, foi verificado que, mesmo a um nível máximo de temperatura (120°C por 0,5 s) abaixo do limiar de dano ao tecido vegetal, o FAQ promove ativação do lançamento de zoósporos viáveis para o meio de suspensão, com relação ao controle (25°C), em vez de inviabilizá-los ou matá-los. Adicionalmente, poucas evidências de IR foram observadas, além de um sensível e não significativo ( $P > 0,05$ ) acúmulo de lignina e perturbações em enzimas associadas à rota de lignificação, insuficientes para promover um controle eficaz do míldio por IR. As respostas

\* Eng. Agron., Dr., Pesquisador, Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, CEP 95700-000, Bento Gonçalves, RS.  
E-mail: fabio.cavalcanti@embrapa.br.

observadas vieram associadas a baixos percentuais de proteção da videira em estruturas vegetativas, em condições de casa de vegetação e campo. No entanto, o FAQ foi capaz de eliminar inóculo ativo da superfície foliar. Por conseguinte, levantou-se a hipótese dessa eliminação superficial do inóculo explicar, ao menos parcialmente, a significativa ( $P < 0,05$ ) redução do míldio larvado nos cachos verificada após aplicação de TPC, durante o desenvolvimento da inflorescência (CAVALCANTI et al., 2014).

Com relação à hipótese da indução de resistência (IR) na célula vegetal, ativada por um eventual estresse imposto pelo tratamento de FAQ, considera-se que a IR deve se sustentar sobre o conceito de *priming* vegetal e uma composição de estresse abiótico (choque de calor) e biótico (doença) (CAVALCANTI et al., 2014). O *priming* é um pré-condicionamento promovido por uma primeira fonte moderada de estresse, tal que a célula se torne mais apta a identificar rapidamente componentes moleculares e químicos associados a um segundo estresse, no caso um processo de parasitismo, resultando em um incremento na eficiência da produção de defesas contra a invasão do patógeno (CONRATH, 2011).

A partir da década passada, vários estudos abordaram respostas de inúmeras espécies de plantas a combinações de dois ou mais estresses de natureza abiótica e biótica (doença). Esses trabalhos demonstraram que cada condição de combinação entre estresses é única em cada planta, resultando em uma enorme variedade de respostas vegetais, e que tal complexidade é uma combinação numerosa de rotas de sinalização e de metabolismo que, às vezes, podem se somar e, às vezes, podem se opor, inibindo-se reciprocamente (ATKINSON; URWIN, 2012; KISSOUDIS et al., 2014). Realmente, estudos puderam evidenciar que estresses causados por elevação de temperatura, em termos gerais, cooperam para enfraquecer e descoordenar mecanismos de defesas vegetais contra a invasão do patógeno, aumentando a susceptibilidade a eles (ZHU et al., 2010; SUZUKI et al., 2014). Por outro lado, estudos também evidenciam respostas de IR e um aumento dos níveis de defesa celular (WIDIASTUTI et al., 2011; 2013).

De todo o modo, estresses ambientais podem gerar efeitos secundários danosos à estrutura celular,

como o estresse oxidativo, causado por *espécies ativas de oxigênio* (AOS). As AOS são formas muito reativas de oxigênio que estão ou num estado parcial de oxidação, ou com elétrons desemparelhados em sua estrutura atômica, tornando-se fortes nucleófilos, capazes de reagir com espécies potencialmente eletrofílicas próximas a duplas ligações, desde fosfolípidios insaturados em membranas celulares a lipídios e proteínas associadas a fotossistemas, em cloroplastos. Exemplos de AOS encontradas em células vegetais podem ser o oxigênio *singleto*, o superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila ( $^{\bullet}OH$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (GILL; TUTEJA, 2010). As AOS, em concentrações descontroladamente altas, podem levar a atividade celular ao colapso. Por isso, de modo bastante conservado, as células vivas possuem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos para regulação da síntese e consumo dessas formas reativas de oxigênio, e para a defesa contra danos oxidativos que podem acontecer em tecidos expostos a estresses ambientais agudos, como alta luminosidade, salinidade, restrição hídrica e estresses térmicos (CAVALCANTI et al., 2004).

As enzimas que compõem o sistema antioxidativo básico da célula, encontrado em todas as organelas, são isoformas diversas de dismutases de superóxido (SOD), catalases (CAT), peroxidases de ascorbato (APX), peroxidases de monolignóis (*guaiacol peroxidases*, GPX) e as enzimas do ciclo do ascorbato/glutationa. Em paralelo a outras modificações enzimáticas e não enzimáticas geralmente minoritárias, a SOD dismuta  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  que, por sua vez, serve de substrato para as atividades de APXs e GPXs como um oxidante em reações envolvendo ascorbato e álcoois derivados de fenilpropanoides, precursores de lignina (GILL; TUTEJA, 2010).

Assim, o presente estudo teve por objetivo investigar o efeito de FAQs de 0,5 s, em dois níveis de temperatura (60°C e 120°C), como possível promotor de injúria sobre o tecido foliar em folhas jovens de videira. Para isso, foram monitoradas, por meio de avaliações dentro de um intervalo após a exposição da folha ao FAQ, as atividades das principais enzimas que compõem o sistema antioxidativo vegetal, os possíveis danos em membranas provenientes de células foliares e alterações em parâmetros fotossintéticos, em simulação ao tratamento TPC sobre o dossel vegetativo.

## Metodologia

### Descrição dos experimentos

Para os ensaios, plantas de videira (*Vitis vinifera* L.) da cultivar Cabernet Sauvignon (CS) e Bordô (*Vitis labrusca*) foram mantidas em sacos de ½ litro contendo uma mistura de areia:argila:húmus (2:0,5:1) e em ambiente de casa de vegetação na Embrapa Uva e Vinho (lat.: 29,1°S, lon.: 51,5°O), sob temperaturas médias de 31°C/24°C (dia/noite) e umidade relativa em torno de 75%, regime de luminosidade de 450 a 500 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e 12 h de fotoperíodo.

Para este trabalho, foram preparados dois experimentos envolvendo dois grupos de plantas. Um grupo de plantas foi utilizado em experimento de coleta de material vegetal (destrutivo) para análises enzimáticas, extração de clorofila, conteúdo relativo de água (%), CRA) e de danos em membranas (%), DM). Plantas com rebrotas de 45 dias foram submetidas à aplicação do tratamento de FAQ. Cada tratamento de FAQ consistiu na aplicação de um fluxo (500 L min<sup>-1</sup>) de ar quente por 0,5 s, em dois níveis de temperatura, a 60°C e 120°C, na altura do limbo foliar, em aplicação única, na tentativa de representar fluxo de ar expelido por um implemento *Thermal Pest Control* (TPC) regulado para aplicação de calor moderada e alta, respectivamente. É conveniente lembrar que a aplicação de FAQ à temperatura de 60°C por 0,5 s produz um aumento súbito de  $\Delta T = 3^\circ\text{C}$ , e, à 120°C por 0,5 s, obtém-se um aumento súbito de  $\Delta T = 8^\circ\text{C}$  (MONTEIRO et al., 2014). O grupo controle (Ctrl-) permaneceu com as folhas expostas à temperatura ambiente (aprox. 25°C  $\pm$  2°C). As parcelas foram dispostas em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições por tratamento, a partir de uma unidade experimental de uma planta por repetição. De cada repetição, foram realizadas coletas de folhas para obtenção de discos foliares e extração de proteínas solúveis totais, às 12, 24, 48 e 72 horas após o tratamento (HAT). A cada coleta, folhas foram destacadas dos ramos sem o pecíolo, lavadas em água destilada, secas em papel absorvente e congeladas com nitrogênio líquido antes do armazenamento em freezer, à temperatura de -80°C.

Em outro grupo de plantas, um ensaio não destrutivo foi realizado para monitoramento dos parâmetros

fotossintéticos (fluorescência), de clorofila e de trocas gasosas. Folhas de rebrotas de 45 dias, de plantas de CS mantidas nas mesmas condições experimentais do ensaio para coleta de material vegetal, foram submetidas a um ensaio envolvendo aplicação de fluxo de ar quente (FAQ) às 8 horas da manhã. As parcelas foram dispostas em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições por tratamento, a partir de uma unidade experimental de uma planta por repetição. Após as aplicações de FAQ, em dois níveis de temperatura (60°C e 120°C), medições de trocas gasosas e fluorescência da clorofila foram tomadas 0, 6, 12, 24, 36 e 48 horas após a aplicação dos tratamentos FAQ (HAT), nas condições de casa de vegetação acima descritas. Nos tempos 12 e 36 HAT, as medições foram feitas às 15 horas da tarde. Nos demais tempos, às 9 da manhã, e, no tempo zero, imediatamente após a aplicação de FAQ.

Medições de trocas gasosas foram obtidas em folhas jovens da parte mediana de rebrotas de 45 dias, devidamente acondicionadas em cubetas escuras de plexiglas, para obtenção de ambiente escurecido e ventilação forçada do sensor do IRGA. Um aparelho IRGA (analisador de fotossíntese e trocas gasosas no infravermelho, IR-gas analyser, LI-6400XT, LI-COR Biosciences, Inc., Nebraska, U.S.) foi utilizado para aferir leituras de (A), taxa fotossintética ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); (gs), condutância estomática ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); (Ci), concentração interna subestomática de  $\text{CO}_2$  ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ) e (E), taxa de transpiração ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Indicadores envolvendo transpiração e fotossíntese, (EC), eficiência de carboxilação, e (EUA), eficiência do uso da água intrínseca, foram calculados a partir de relações conceituais entre variáveis lidas pelo IRGA, a saber:  $\text{EC} = \text{A/Ci}$  e  $\text{EUA} = \text{A/gs}$  (FLEXAS et al., 2010).

A partir das mesmas folhas usadas para medições de trocas gasosas, variáveis envolvendo fluorescência de fotossistemas foram obtidas por meio de um fluorômetro com pulso de luz de amplitude modulada (Pulse-amplitude modulation, Junior-PAM, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemanha). Os seguintes parâmetros foram medidos, a partir das folhas jovens previamente acondicionadas por 30 min no escuro: Y(II), rendimento quântico efetivo de conversão

fotoquímica do PSII; (ETR), taxa de transporte de elétrons; (qP), coeficiente de extinção fotoquímica do PSII; (NPQ), coeficiente de extinção não fotoquímica do PSII; (Fv/Fm), rendimento quântico potencial (máximo) do fotossistema II. Após o acondicionamento, as folhas foram expostas à luz para receberem, por 10 s, pulsos de luz actínica ( $270 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) de uma fibra ótica conectada ao fluorômetro. Adicionalmente, teores de clorofilas totais (a + b) (CLF,  $\mu\text{g gMF}^{-1}$ ) foram monitorados por meio do uso, sobre as folhas estudadas, de um sensor do tipo SPAD 502 (Spectrum Technologies, Illinois, U.S). Os resultados foram confirmados posteriormente por determinação química de clorofilas totais, que foram extraídas (1:20 m/v) em acetona 85%, sendo verificadas absorvâncias para alimentar a equação de determinação:  $\text{CLF} = [(13,7 \times \text{OD}_{664}) - (5,76 \times \text{OD}_{647}) + (25,80 \times \text{OD}_{647}) - (7,60 \times \text{OD}_{664})]$  (KNUDSON et al., 1977).

## Determinações de enzimas antioxidantes e danos em membranas

Um grama de material fresco de folhas de videira, provenientes do experimento destrutivo acima descrito, foi homogeneizado em almofariz e pistilo resfriados, com 5 mL de fosfato de potássio (PBS, 100 mM pH 7,2), contendo 0,1 mM EDTA. Após a maceração e filtração e membrana de trama fina, o extrato foi centrifugado em  $13.000 \text{ g} \times 15 \text{ min}$  e o sobrenadante foi coletado para as determinações enzimáticas. Para efeito do cálculo da atividade enzimática relativa, o teor de proteínas solúveis totais foi determinado usando-se o ensaio de Bradford (1976), após cálculo de curva padrão usando-se albumina sérica bovina como padrão.

A atividade de peroxidases de guaiacol (GPX, EC 1.11.1.7) foi determinada pela mistura de 100  $\mu\text{L}$  do extrato a 2 mL de uma solução contendo guaiacol 20 mM e  $\text{H}_2\text{O}_2$  20 mM, em tampão de extração. Após incubação a  $32^\circ\text{C}$  por 10 min, a absorvância foi tomada a 480 nm (URBANEK et al., 1991). A atividade de catalases (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de extrato em 3 mL de uma solução contendo 20 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em tampão de extração. Da mistura em banho de  $30^\circ\text{C}$ , foi medido o decréscimo na absorvância de 240 nm durante 10 min. A atividade absoluta da enzima foi calculada com o uso do coeficiente de extinção molar de  $36 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (HAVIR;

McHALE, 1987). A atividade de peroxidases de ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) foi determinada pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de extrato em uma solução contendo 0,5 mL de ácido ascórbico e 2 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , diluídos em tampão PBS 50 mM, pH 6,0. A queda na absorvância em 290 nm foi monitorada em intervalos durante 180 s (KOSHIBA, 1993). Para as enzimas GPX, CAT e APX, uma unidade de atividade foi definida como sendo a mudança de 1,0 unidade de absorvância (UA) no comprimento de onda adequado ao substrato/produto enzimático, por miligrama de proteína solúvel por minuto ( $\text{UA mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) (CAVALCANTI et al., 2007). A atividade de dismutases de superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) foi determinada pela adição de 50 mL de extrato enzimático total a uma solução contendo 13 mM de L-metionina, cloreto azul de p-nitrotetrazólio (NBT), 100 mM de EDTA e 2 mM de riboflavina, em tampão de extração. A reação foi conduzida em uma caixa hermética iluminada por lâmpada fluorescente de 30 W a  $25^\circ\text{C}$ , em poços de placa de 96 cavidades (350  $\mu\text{L}$ /cavidade). A reação foi iniciada com o acionamento da lâmpada, em um intervalo de 5 min. A formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi medida pelo aumento da absorvância a 630 nm, em leitor de placas de 96 cavidades. O ensaio teve controles sem mistura enzimática e sem exposição à luz (VAN ROSSUN et al., 1997). Uma unidade de atividade SOD foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de inibir 50% da fotorredução do NBT e expressas como unidade de atividade SOD por MG de proteína por minuto ( $\text{UA mgP}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ). Todos os ensaios enzimáticos foram conduzidos em triplicatas para cada amostra.

Para a determinação de integridade de membranas, dez discos foliares foram retirados por meio de um perfurador cilíndrico de base com diâmetro de 10 mm e, após lavagem, levados a uma placa de Petri com água deionizada. Os discos foram mergulhados em água durante 30 min e transferidos para frascos de Erlenmeyers contendo 10 mL de água deionizada, onde permaneceram em banho-maria durante 24 horas a  $25^\circ\text{C}$ , sob agitação ocasional. Por fim, o sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio e foi realizada a leitura de condutividade, de acordo com o método de Blum; Ebercon (1981). Após a leitura do sobrenadante, os discos foram transferidos para novos frascos de Erlenmeyers com 25 mL de água deionizada, onde receberam um tratamento térmico de  $100^\circ\text{C}$  por 1 h e foram resfriados para

nova leitura de condutividade e estimação do percentual de dano de membrana (%DM), a partir da relação entre o valor da primeira leitura de condutividade e o valor da segunda.

Comparativamente, foi determinado o percentual de dano de membrana através do vazamento celular de  $K^+$ , a fim de confirmar a determinação feita pela medida de condutividade (CAVALCANTI et al., 2004). Todos os passos da determinação por condutividade acima descritos foram repetidos, mas substituídos por leitura de  $K^+$  em fotômetro de chama, após calibração. O %DM por vazamento de  $K^+$  foi estimado pela relação entre a primeira e a segunda leitura.

Para determinação do conteúdo relativo de água (CRA) em folhas, foram retirados ao acaso 30 discos foliares de 10 mm de diâmetro e determinada sua massa fresca (MF1). Os discos foram transferidos para uma placa de Petri contendo água destilada e deixados sob iluminação forçada por um período de 6 h. Em seguida, os discos foliares foram removidos e secos. Imediatamente, os discos foram pesados para obtenção de massa de tecido túrgido ou massa de tecido saturado (MF2). Por fim, os discos foram colocados em nova placa de Petri e levados a uma estufa de ventilação forçada de ar, a 75°C, durante dois dias, para obtenção da massa seca (MS). Os cálculos de CRA foram feitos por meio da relação:  $CRA (\%) = [(MF1 - MS)/(MF2 - MS)] \times 100\%$  (SLAVIK, 1974).

## **Análise estatística**

Foram realizadas análises de estatística descritiva, testes de normalidade dos dados numéricos, análise de variância e testes (t de Student e Tukey), todos com nível de significância de 5%. Os cálculos foram realizados com o auxílio da ferramenta OriginPro 8 (OriginLab Corp.).

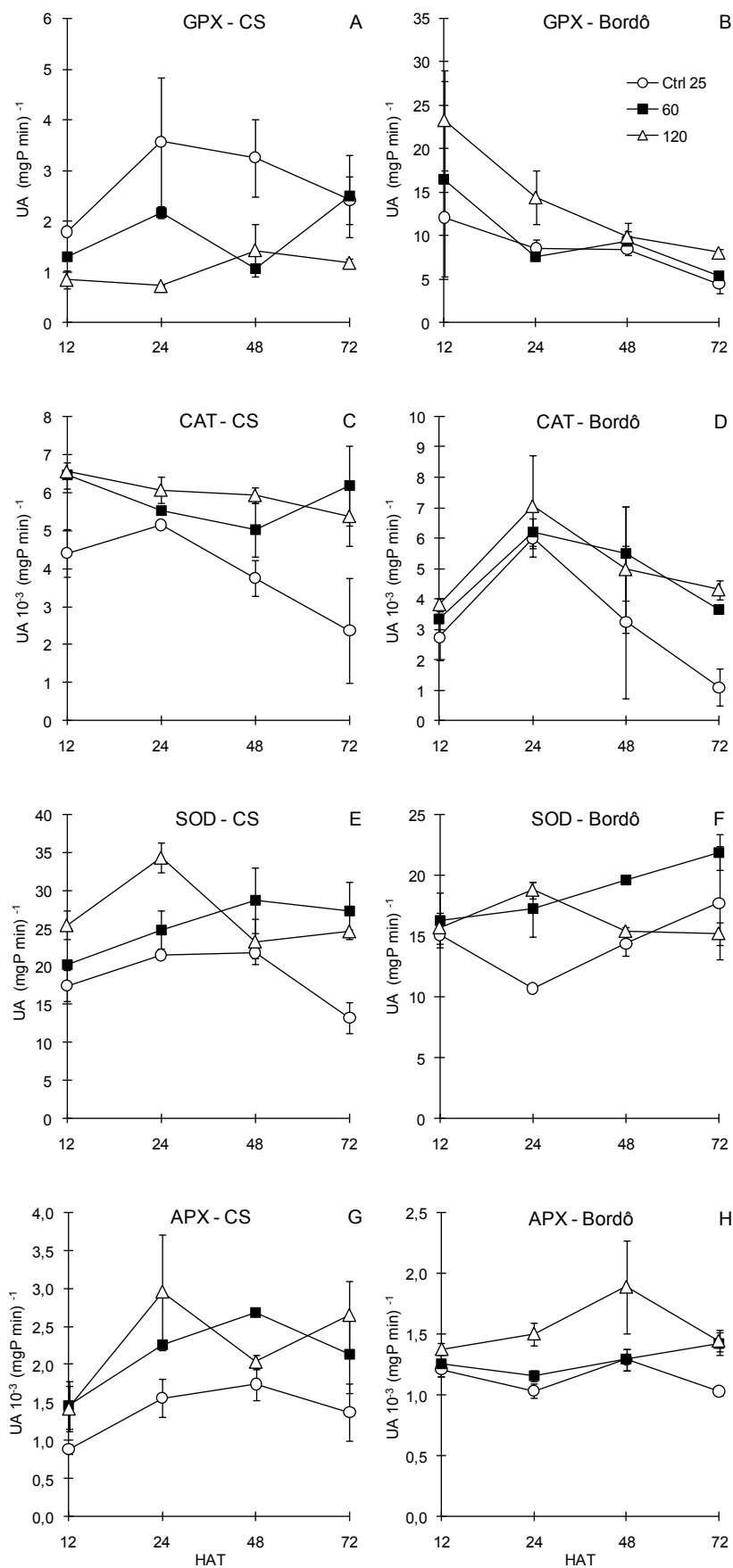
## **Resultados e Discussão**

Nesse estudo, ensaios foram conduzidos para coleta de folhas de rebrotas de videira das cvs. Cabernet Sauvignon (CS) e Bordô, em varas de 45-60 dias, conduzidas em ambiente controlado e submetidas a tratamentos de fluxo de ar quente (FAQ) por simulação ao tratamento térmico

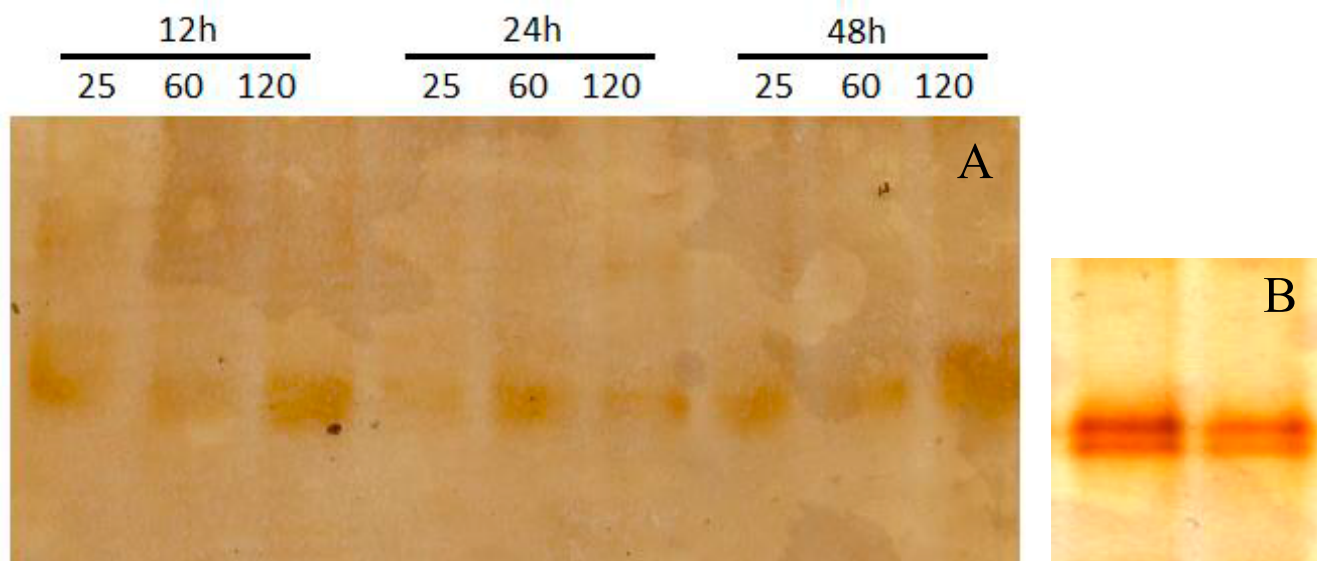
do TPC sobre o dossel. O tecido foliar coletado forneceu massa fresca para extração de proteínas solúveis totais para análise da atividade de enzimas envolvidas na regulação do metabolismo antioxidativo vegetal, bem como discos foliares para ensaios de variáveis associadas à hidratação do tecido foliar e integridade de membranas celulares.

Foram observadas reduções nas atividades de peroxidases de guaiacol (GPX) das plantas de CS tratadas por FAQ a 60°C e 120°C, a partir de 12 horas após a imposição do tratamento (HAT), em relação às plantas controle (Fig. 1A). De modo contrário, em 'Bordô', excetuando-se a 48 HAT, foi observado um discreto aumento na atividade de GPX, com relação aos níveis do controle (Ctrl) e do FAQ a 60°C, em todo o intervalo estudado (Fig. 1B), sendo o perfil confirmado pela revelação de duas isoformas da enzima, em gel de poliacrilamida (Figs. 2A e 2B).

Considerando as respostas de catalases (CAT) da CS, os níveis de atividade da enzima do tecido exposto a 120°C foram maiores que os mostrados pelas amostras da temperatura controle, durante todo o intervalo estudado, os quais não diferiram das folhas de CS submetidas ao FAQ de 60°C (Fig. 1C). Na cv. Bordô, as atividades de CAT não sofreram alteração em folhas submetidas a 60°C e 120°C, e, exceto em 72 HAT, catalases de 'Bordô' não diferiram dos níveis do controle (Fig. 1D). Com relação às atividades de dismutases de superóxido (SOD), tanto CS quanto 'Bordô' responderam com um discreto aumento em folhas submetidas aos dois níveis de temperatura de FAQ estudados (Figs. 1E e 1F). Enquanto as respostas de atividade SOD a 60°C de ambas as cultivares pareceram aumentar ao longo do intervalo estudado, em folhas submetidas a 120°C, houve um aumento súbito entre 12 e 24 HAT, seguida de queda acentuada, com destaque para CS (Fig. 1E). Com relação às respostas envolvendo peroxidases de ascorbato (APX), foi verificado, em ambas as cultivares, um aumento nas atividades de APX em amostras de FAQ a 120°C, entre 12-72 HAT (Figs. 1G e 1H). Em amostras expostas a 60°C, um aumento com relação ao controle foi observado apenas em CS, ao longo do intervalo estudado. Em 'Bordô', respostas de APX em folhas submetidas a 60°C seguiram os níveis do controle (25°C), exceto em 72 HAT (Fig. 1H).



**Fig. 1.** Atividades de peroxidases (GPX), catalases (CAT), dismutases de superóxido (SOD) e peroxidases de ascorbato (APX) em folhas de videira cvs. C. Sauvignon e Bordô, em rebrotas de 40 dias. Tratamentos de fluxo de ar quente foram aplicados 60°C (-■-) e 120°C (-△-) por cinco segundos, e plantas controle 25°C (Ctrl,-□-) não tratadas. Respostas enzimáticas foram avaliadas 12, 24, 48 e 72 horas após o tratamento térmico (HAT). Barras de erros indicam desvio-padrão da média.



**Fig. 2.** Eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições nativas, revelando isoformas de peroxidases. A. Gel mostra duas isoformas aglutinadas de folhas de videira, cv. Bordô, coletadas em 12, 24 e 48 HAT, cada tempo contendo controle (Ctrl-, 25°C) e amostras fluxo de ar quente a 60°C e 120°C por 5 s. A revelação com DAB pôde confirmar o resultado colorimétrico. B. Detalhe de uma região corada mostra que a marcação principal no gel A é, provavelmente, resultado da atividade de duas isoformas com massas moleculares similares. Proteínas solúveis totais carregadas em cada poço = 15 µg.

Em termos gerais, considerando ambas as cultivares, a imposição de FAQ promoveu um aumento sensível nas respostas das atividades de enzimas removedoras de espécies ativas de oxigênio (*AOS-scavenging enzymes*) relativamente sustentadas entre 12-72 HAT. Essas observações indicam que a célula foliar da videira pode ter respondido com aclimação a um fator de estresse oxidativo imposto por um estresse primário, no caso, causado pelo FAQ. De um modo geral, estresses primários são eventos ambientais que podem causar mudanças no metabolismo, aclimação celular e estresses secundários como o estresse oxidativo (ZHU, 2002) e geração de *espécies ativas de oxigênio* (AOS).

As AOS são extremamente citotóxicas em concentrações muito baixas e alteram o funcionamento normal do metabolismo, promovendo danos químicos em lipídios, ácidos nucleicos e proteínas (ALSCHER et al., 2002). Formação de AOS pode ocorrer em locais específicos da célula vegetal, em organelas como cloroplasto e mitocôndria. No cloroplasto, que é um sítio importante para o presente trabalho, por causa do foco no estudo da fotossíntese da célula exposta ao FAQ, AOS podem ser formados na fase fotoquímica, na terminação da cadeia transportadora de elétrons do PSI, a partir da oferta de  $O_2$  produzido na fotólise da água e/ou ofertado pelo aumento da razão  $O_2/CO_2$  em

condição de elevação da temperatura (abaixo no texto, haverá uma retomada na discussão desse efeito), atrelada a uma redução na disponibilidade de  $NADP^+$ , na região da redutase da ferredoxina- $NADP^+$  (CAVALCANTI et al., 2004). Para alívio e regulação do papel extremamente reativo dessas AOS as células (inclusive os cloroplastos) possuem um sistema muito organizado de proteção oxidativa, baseado em atividade enzimática, que reconverte essas espécies em formas oxidantes menos reativas. Defesas enzimáticas incluem a peroxidase de monolignóis (GPX), as peroxidases de ascorbato (APX), as peroxidases de glutatona (GP), dismutases de superóxido (SOD) e catalases (CAT) que, atuando sozinhas ou em concerto, podem regular a formação de AOS em sítios de redução desequilibrados devido à imposição de um estresse ambiental (CAVALCANTI et al., 2004; 2007).

No cloroplasto, há um sistema de regulação/eliminação do poder oxidativo envolvendo as enzimas em estudo. Na região da membrana do tilacoide, do lado do estroma, o superóxido ( $O_2^-$ ) formado pela redução do oxigênio *tríples* é dismutado a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) por uma CuZnSOD e, em seguida, reduzido a água ( $H_2O$ ) por APXs ancoradas ou não na membrana, gerando monodeidroascorbato (MDHA), o qual, por sua vez, pode sequestrar um elétron da



ferredoxina do PSI para retornar à forma ascorbato. Em ambiente de estroma, os superóxidos são dismutados por isoformas locais de SOD em  $H_2O_2$ , que irão “alimentar” um ciclo do *ascorbato-glutationa* (Halliwell-Asada), que é classicamente composto pelas enzimas APX, redutase do monodeidroascorbato, uma glutaredoxina ou uma redutase do deidroascorbato, uma redutase da glutatona e, por fim, uma glutatona peroxidase que também pode consumir  $H_2O_2$  (MITTLER, 2004).

Por isso, acata-se a hipótese de que, se as atividades de enzimas diretamente envolvidas na remoção, regulação e alívio do poder oxidativo de AOS (formadas por desvios de elétrons promovidos por estresses ambientais primários) se alteram, (i) há uma possível perturbação oxidativa (estresse oxidativo) em andamento no ambiente celular; e (ii) a célula vegetal é capaz de se aclimatar para responder a esta perturbação, e esta aclimação faz parte de um mecanismo de defesa antioxidativo enzimático da célula vegetal (APEL; HIRT, 2004; CAVALCANTI et al., 2004).

Adicionalmente, um sistema de proteção ao excesso de luminosidade envolvendo reconversão de xantofilas embebidas na membrana do tilacoide para dissipação de calor pode atuar também em condições de aumento de temperatura, com eventual acumulação de zeaxantina e aumento da capacidade de dissipação de calor (TAIZ; ZEIGER, 2010). Isso ocorre atrelado a rotas de alívio oxidativo em tilacoides: o monodeidroascorbato (MDHA) pode suprir elétrons em quantidade suficiente para a de-epoxidase da violaxantina (VDE), regulada positivamente na condição de estresse, sintetizar mais rapidamente zeaxantina, que, por sua vez, irá contribuir com um sensível aumento na capacidade de dissipar calor pelos cloroplastos (SMIRNOFF, 1996).

Uma possível consequência de um estresse oxidativo causado por fator primário (neste estudo, imposto pelo FAQ) é a peroxidação de lipídios. A peroxidação de lipídios é considerada a mais imediata e importante consequência dos danos oxidativos causados por AOS, que podem ocorrer nos organismos vivos celulares submetidos a estresses ambientais. Muitas vezes, o dano de membrana é tomado como parâmetro de estudo suficiente para determinar o nível de dano oxidativo

imposto por estresses diversos (GILL; TUTEJA, 2010). O mecanismo químico da peroxidação de lipídios poli-insaturados é bem elucidado, e os subprodutos dessa peroxidação, quase sempre iniciada por um radical hidroxila AOS ( $HO^{\cdot}$ ) derivado de superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), promovem a dispersão do poder oxidativo iniciado, através de passos de propagação em cadeia de aldeídos, hidroperóxidos, epóxidos e peroxilas lipídicas fortemente reativos. Por consequência, são observadas perdas nas características físico-químicas das membranas plasmáticas (GILL; TUTEJA, 2010; CATALÁ, 2012), o que pode resultar em vazamento de eletrólitos do meio interno para o meio externo das membranas (CAMPOS et al., 2003; CAVALCANTI et al., 2004).

No presente trabalho, o vazamento de eletrólitos, como indicador de dano percentual em membranas, foi medido por duas metodologias: pela detecção do vazamento de  $K^+$  para o meio externo aquoso e por condutividade elétrica ( $\mu S$ ) (Tabela 1), ao longo de 12, 24, 48 e 72 horas após imposição de FAQ (HAT). Em termos gerais, não foram observadas alterações significativas nas duas variáveis, entre folhas tratadas por FAQ nas duas temperaturas estudadas e os controles mantidos em 25°C, com exceção das leituras de conteúdo relativo de água (CRA) a 12 e 48 HAT e no vazamento de  $K^+$  a 48 HAT. Tal resultado reforça a não ocorrência de estresse celular pelo calor imposto pelo FAQ, nem a 120°C. Com relação ao vazamento de eletrólitos, não foi possível verificar, pelos dois métodos, valores que atestassem rompimento de estruturas de membrana, o que eventualmente poderia ocorrer tanto por efeito do choque térmico agressivo, tanto por ação de uma forte peroxidação de lipídios. Contudo, ambas as respostas não foram evidenciadas, demonstrando que o tratamento FAQ, mesmo a 120°C ( $\Delta T = 8^{\circ}C$ ), não causou danos à integridade das membranas de folhas da cv. Cabernet Sauvignon, a despeito da leve perturbação oxidativa aparentemente havida (Figura 1).

Ao mesmo tempo, foi possível verificar que o FAQ pôde promover uma leve e não significativa ( $P > 0,05$ ) desidratação do tecido entre 12-48 HAT, seguida de recuperação do balanço de CRA folhas tratadas/folhas controle, após 48 HAT. Porém, não foi possível afirmar que houve uma recuperação nos valores ‘absolutos’ de CRA, em folhas submetidas ao FAQ, uma vez que, a 72 HAT, foi observada,



**Tabela 1.** Valores percentuais de conteúdo relativo de água (CRA) e dano em membranas em folhas de videira, cv. Cabernet Sauvignon, submetidas à aplicação de FAQ.

(°C) <sup>a</sup>	CRA (%)				DM (%) <sup>c</sup>							
	Horas após tratamento (HAT) <sup>b</sup>				(μS)				(K <sup>+</sup> )			
	12 <sup>d</sup>	24	48	72	12	24	48	72	12	24	48	72
<b>25</b>	86,7*	85,6	88,9*	69,1	18,3	20,9	17,7	38,8	30,1	23,6	43,1*	33,4
<b>60</b>	80,7	84,5	75,7	70,1	17,0	14,2	13,7	34,3	29,9	26,6	33,7	38,8
<b>120</b>	73,8	79,3	74,4	75,5	18,8	19,5	15,8	25,8	30,7	23,1	34,5	29,6

<sup>a</sup> Fluxo de ar quente foi aplicado sobre o limbo foliar em dois níveis de temperatura (60°C e 120°C), durante 5 s. As folhas do Ctrl permaneceram sob temperatura ambiente (25°C).

<sup>b</sup> Amostras de folhas foram coletadas 12, 24, 48 e 72 horas após imposição do fluxo do ar quente (HAT).

<sup>c</sup> Danos em membranas foram medidos por dois métodos: (i) por condutividade (μS) e (ii) por vazamento de potássio para fora do simplasto (K<sup>+</sup>).

<sup>d</sup> Asteriscos marcam valores significativamente diferentes dos demais, dentro de cada tempo avaliado em HAT, de acordo com o teste t de Student (P < 0,05).

na verdade, muito mais uma redução no CRA da planta controle do que uma recuperação das folhas expostas ao FAQ.

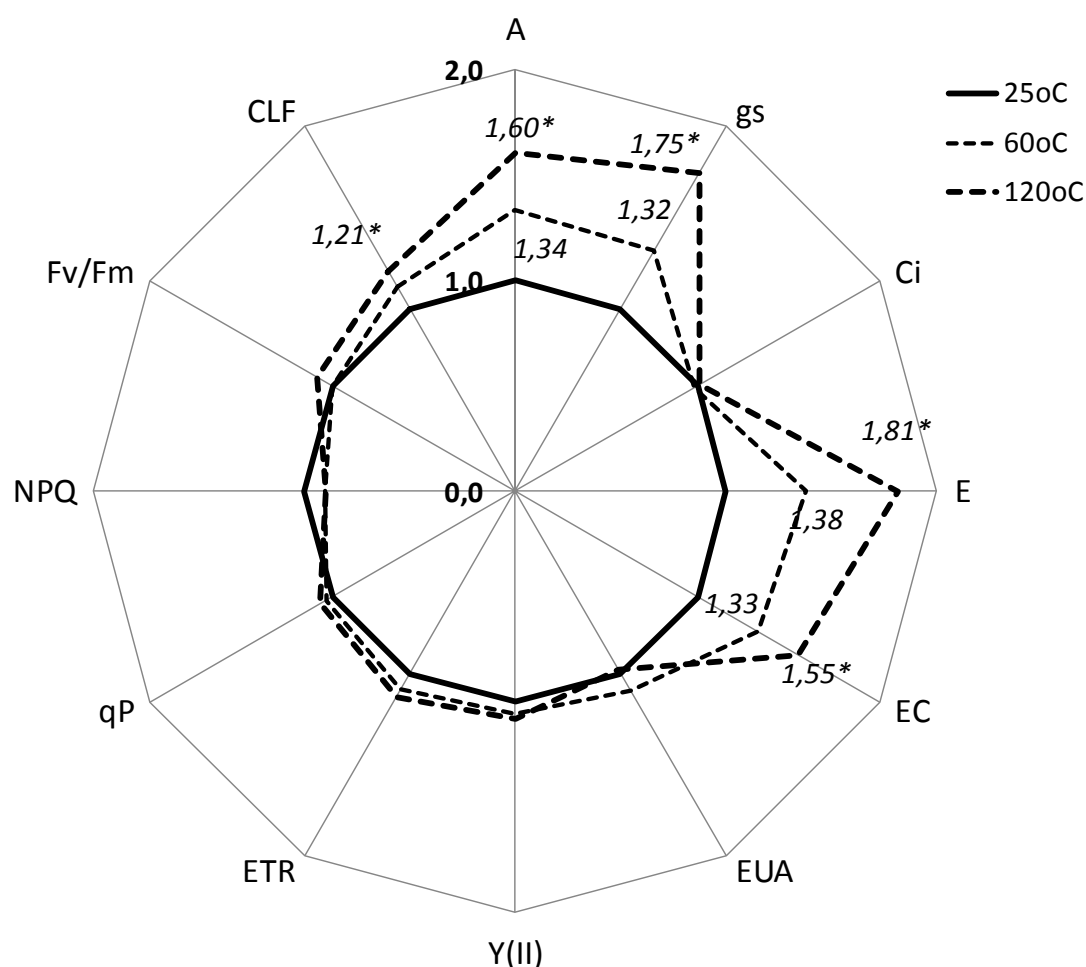
Outra observação importante registrada foi a de que os FAQs experimentados produziram alterações discretas, mas não significativas (P > 0,05), nos níveis de umidade percentual da superfície foliar monitorados, que aumentaram mais ou menos proporcionalmente aos níveis de temperatura do FAQ, em zero hora após os tratamentos (0 HAT). Em folhas submetidas ao FAQ de 60°C, foram observados valores entre 43,1 ± 2,4% de umidade de superfície, enquanto que, no FAQ de 120°C, foram observados valores entre 46,0 ± 2,0%. Paralelamente, em folhas deixadas à temperatura ambiente (25°C), foi verificada média de 40,3 ± 1,8%. Vale lembrar que os valores observados na superfície foliar entre todas as parcelas experimentais, a zero HAT, oscilaram em torno da umidade relativa do ar (UR%) medida no dia da avaliação, em torno de 40%. A despeito de não terem sido verificadas diferenças estatísticas entre os valores observados para a umidade da superfície foliar, foi possível evidenciar que a umidade foliar não cai sob a exposição dos tratamentos de FAQ.

Portanto, tais evidências podem negar uma hipótese comum ventilada entre os técnicos, a de que uma virtual redução da umidade de superfície foliar atribuída ao FAQ poderia gerar um ambiente desfavorável ao processo de parasitismo do patógeno, retardando ou impedindo um processo

de doença. Contudo, mesmo que as evidências observadas apontem para a negação da hipótese da redução da umidade de superfície foliar pelo FAQ, ensaios adicionais devem ser feitos envolvendo ambientes com percentuais maiores de umidade relativa do ar, a fim de confirmar se realmente existe uma eventual redução nos teores de umidade da superfície, em folhas de videira submetidas ao FAQ.

É possível verificar que estresses por calor podem inibir a fotossíntese por mecanismos envolvendo eventos fotoquímicos e inibição da atividade da rubisco (SUZUKI et al., 2014). Por exemplo, em estudo envolvendo plantas de algodão sob condições de estresse térmico, foram vistas reduções na taxa fotossintética e na condutância estomática em folhas submetidas a altas temperaturas, sendo que esses efeitos tornavam-se ainda mais pronunciados quando as parcelas eram submetidas a estresse térmico mais restrição hídrica, talvez a condição mais severa de combinação de estresses (CARMO-SILVA et al., 2012).

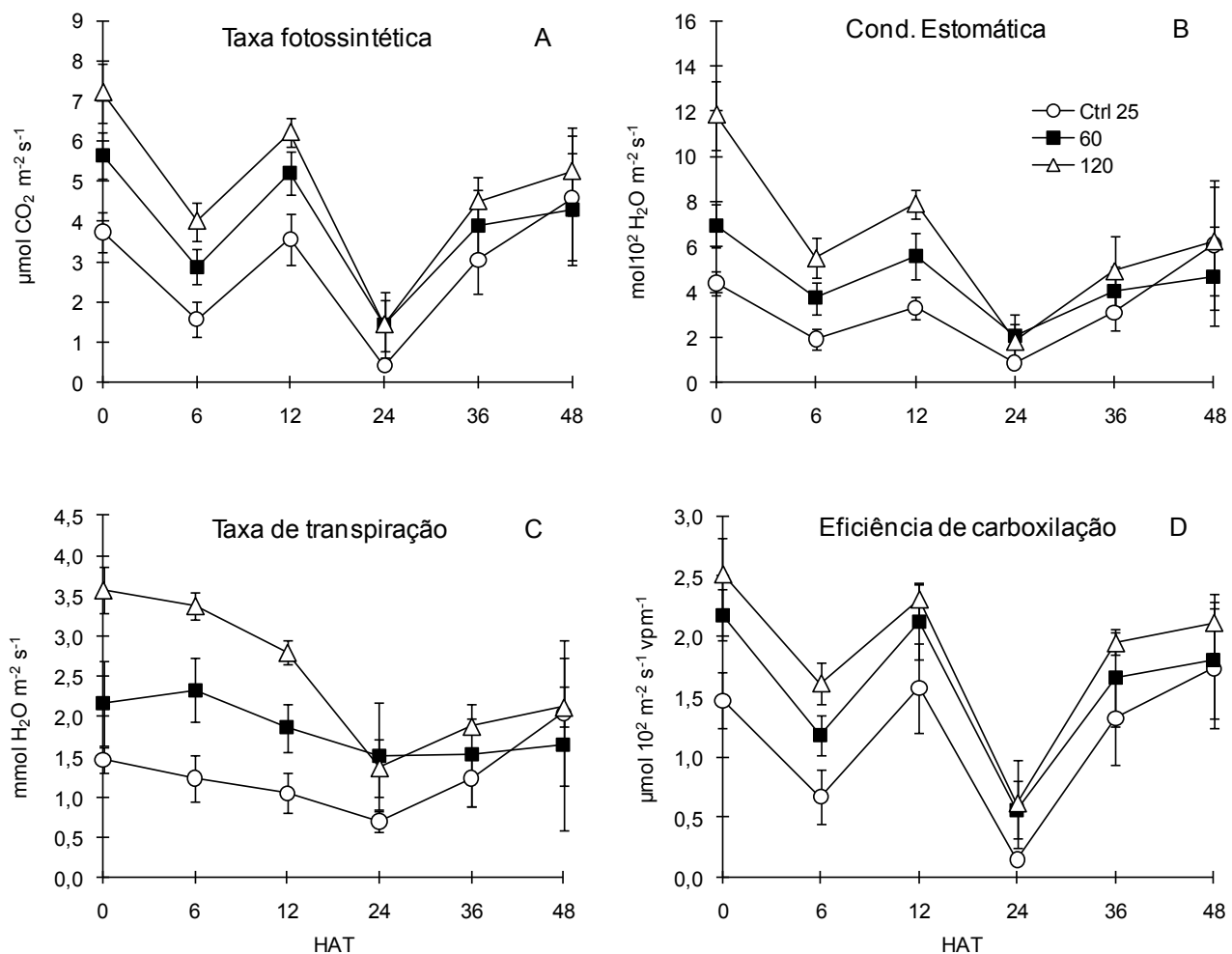
Considerando a fase de carboxilação da fotossíntese, o presente estudo evidenciou respostas fotossintéticas contrárias às verificadas em folhas de plantas que efetivamente entram em uma condição fisiológica de estresse, quando submetidas a altas temperaturas (Fig. 3). Os resultados mostram que provavelmente não houve resposta associada a estresse térmico em folhas



**Fig. 3.** Influência de dois níveis de fluxo de ar quente (60°C e 120°C) sobre parâmetros fotoquímicos e de trocas gasosas em folhas de videira, cv. Cabernet Sauvignon, considerando a área abaixo da curva (AAC) de respostas da variável observada, ao longo de seis avaliações (6-72 HAT). Todos os valores estão representados com relação a seus respectivos controles negativos (valores medidos a partir de folhas não tratadas, deixadas a 25°C), referenciados com peso = 1,0 no gráfico de radar, indicados pela linha contínua. Variáveis observadas foram: (A), taxa fotossintética ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); (gs), condutância estomática ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); (Ci), concentração interna subestomática de  $\text{CO}_2$  ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ); (E), taxa de transpiração ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); (EC), eficiência de carboxilação (A/Ci); (EUA), eficiência do uso da água (A/gs); Y(II), rendimento quântico efetivo de conversão fotoquímica do PSII; (ETR), taxa de transporte de elétrons; (qP), coeficiente de extinção fotoquímica do PSII; (NPQ), coeficiente de extinção não fotoquímica do PSII; (Fv/Fm), rendimento quântico potencial do fotossistema II; CLF, teor de clorofilas totais ( $\mu\text{g gMF}^{-1}$ ). Em cada variável, asteriscos indicam diferenças significativas entre valores apresentados pelo FAQ e seu respectivo controle, de acordo com o teste t de Student ( $P < 0,05$ ).

submetidas às doses estudadas de FAQ. Realmente, o aumento da taxa fotossintética (A), em resposta ao aumento de temperatura foliar promovido pelo FAQ, pode ter sido estimulado pela ação da temperatura sobre uma série de pontos limitantes da fotossíntese, em função da disponibilidade de  $\text{CO}_2$  (SAGE; KUBIEN, 2007). As aplicações de FAQ do estudo provavelmente submeteram a folha a temperaturas próximas da *temperatura ótima de resposta em taxa fotossintética* (SAGE; KUBIEN, 2007; YAMORI et al., 2014). Nessas temperaturas, os pontos limitantes da fotossíntese podem ser minimizados e as reações de

carboxilação são aceleradas em uma faixa estreita de temperatura. São pontos limitantes da fotossíntese em plantas C3 (como a videira) submetidas a altas temperaturas a regulação da *ativase* da rubisco (RA), a atividade da rubisco limitada por temperatura e  $\text{CO}_2$ , etapas do ciclo de Calvin associadas à regeneração da ribulose 1,5-bifosfato (RuBP) e, em temperaturas mais baixas, a regeneração de fosfato inorgânico (Pi). Adicionalmente, aumentos de temperatura podem produzir aumento do rendimento quântico da fixação de carbono e redução da taxa respiratória (SAGE; KUBIEN, 2007; YAMORI



**Fig. 4.** Perfil de respostas fotossintéticas em células foliares da videira, cv. Cabernet Sauvignon, em rebrotas de 40 dias, ao longo de 72 horas após imposição dos tratamentos (HAT). A. Taxa fotossintética (A,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); B. Condutância estomática (gs,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); C. Taxa de transpiração (E,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); D. Eficiência de carboxilação (EC). Tratamentos de FAQ foram aplicados 60°C (■) e 120°C (△) por 0,5 s, e plantas controle 25°C (Ctrl, ○) não tratadas. Parâmetros foliares foram avaliados 0, 6, 12, 24, 36 e 48 HAT por meio de um analisador portátil de fotossíntese no infravermelho (LI-6400XT, Li-Cor). Barras de erros indicam desvio-padrão da média.

et al., 2014). Sendo assim, valores ótimos de temperatura para a fase bioquímica da fotossíntese possuem fortes componentes de ordem fisiológica e genética. Quando esses ótimos de temperatura são superados, as taxas fotossintéticas decaem rapidamente, formando curvas típicas de A ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) versus °C em “forma de sino” (TAIZ; ZEIGER, 2010).

O rendimento quântico da fixação de carbono também pode variar com a temperatura e potenciais de  $\text{CO}_2$  pelo efeito da relação carboxilase:oxygenase da rubisco. À medida que a temperatura é aumentada, o rendimento quântico de plantas C3 pode ser reduzido em parte pelo afastamento da temperatura ótima, em parte pelo aumento da disponibilidade de oxigênio para a

atividade oxygenase da rubisco (TAIZ; ZEIGER, 2010). Quando isso não é observado, geralmente se considera que houve pouca influência da variação de temperatura sobre os parâmetros de fotossíntese.

Além do aumento nas taxas de fotossíntese (A) imposto pela aplicação das doses de FAQ sobre as folhas, foram observados aumentos significativos ( $P < 0,05$ ) nas taxas de transpiração (E) e na condutância estomática (gs) (Fig. 3 e 4). Como os aumentos das taxas fotossintéticas responderam de forma paralela a valores praticamente inalterados de pressão de  $\text{CO}_2$  subestomática ( $C_i$ ), isso se refletiu em um aumento da eficiência da carboxilação (EC) das folhas submetidas às doses de FAQ experimentadas (Fig. 3 e 4). Entretanto, é

essencial salientar que os aumentos pronunciados nas variáveis (A, E, gs e EC) ocorreram apenas durante as primeiras 12 horas após a imposição dos tratamentos (12 HAT), antes de retornarem aos níveis típicos do controle (25°C) durante o restante do intervalo de monitoramento (Fig. 4), e que as oscilações comuns a todos os tratamentos estudados se deveram basicamente às condições gerais de luminosidade e temperatura encontradas no intervalo de monitoramento, 0-48 HAT, dentro do qual a fotossíntese foi medida (HENDRICKSON et al., 2004).

Nesse mesmo intervalo, considerando folhas de videira submetidas ao FAQ, não foram registradas alterações significativas nos parâmetros de eficiência do PSII, rendimentos quânticos e de *quenching* (coeficientes de extinção) fotoquímicos e não fotoquímicos (Fig. 3). Vale lembrar que a extinção fotoquímica (qP) se refere à proporção dos centros de reação do PSII que estão abertos, e o *quenching* não fotoquímico (NPQ) indica um nível de fluorescência máxima (Fm) no qual se tem a máxima eficiência fotoquímica com um mínimo de dissipação térmica (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Dessa forma, as evidências de falta de alteração nas variáveis fotoquímicas reforçam a hipótese de que FAQs a 60°C, e mesmo a 120°C, não possam causar danos permanentes aos fotossistemas nos tilacoides de células foliares da videira, muito provavelmente pelo exíguo tempo de exposição ao choque térmico, o que redundaria em pequenas variações de temperatura foliar,  $\Delta T = 3^\circ\text{C}$ , para FAQ de 60°C e  $\Delta T = 8^\circ\text{C}$ , para FAQ de 120°C (MONTEIRO et al., 2014).

## Considerações Finais

- O fluxo de ar quente (FAQ), nas doses estudadas, é capaz de promover discreto aumento nas respostas nas atividades de enzimas antioxidativas em folhas de videira das cvs. Cabernet Sauvignon e Bordô, entre 12-72 HAT, a excetuar-se por respostas de GPX de Cabernet Sauvignon. Em tais plantas, a atividade de GPX diminui após a exposição das folhas ao FAQ. De todo o modo, o perfil de respostas enzimáticas indica uma perturbação oxidativa na célula foliar, imposta pelo tratamento baseado em choque de calor.

- Os tratamentos de FAQ promovem leve redução no conteúdo relativo de água (CRA) de folhas de Cabernet Sauvignon, com um indicativo de recuperação em 72 HAT. Os tratamentos de FAQ não alteram os teores de umidade da superfície foliar, em situação onde a folha é exposta a um %UR do ar relativamente baixo, em torno de 40%.

- Os tratamentos de FAQ por 0,5 s, a 60°C ou a 120°C, e a consequente perturbação oxidativa celular evidenciada não impõem danos a membranas de células foliares de videira, cv. Cabernet Sauvignon.

- Os tratamentos de FAQ induzem aumentos transientes na taxa fotossintética, condutância estomática, taxa de transpiração e na eficiência da carboxilação. Mas esses aumentos são recuperados ao nível do controle em até 12 HAT. Os FAQs, mesmo na maior temperatura, não alteram significativamente parâmetros fotoquímicos, rendimentos quânticos e da eficiência do PSII, na fotossíntese de folhas de videira da cv. Cabernet Sauvignon.

## Agradecimentos

Ao Dr. Henrique P. dos Santos, do Laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa Uva e Vinho, pelo empréstimo dos instrumentos para medição de parâmetros fotossintéticos e clorofila.

Ao colega Daniel Antunes Souza, pelo apoio na condução dos ensaios.

Ao CNPq e à Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Universidade Federal do Ceará (UFC), pela anuência e concessão da transferência institucional dos equipamentos associados a projetos coordenados pelo autor, da UFC para Embrapa Uva e Vinho, conforme DOU Nº 81 de 29 de abril de 2011, que tornou possível a realização dessa pesquisa.

## Referências Bibliográficas

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.

- APEL, K.; HIRT, H. Reactive Oxygen Species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ATKINSON, N. J.; URWIN, P. E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 10, p. 3523-3544, 2012.
- BARRA, F. M. L. **Equipment for generating and distributing heat for thermal control of pests**. Int. A01G13/06. WO 2011085463 A1. 21 jul. 2011.
- BLUM A.; EBERCON, A. Cell Membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. **Crop Science**, v. 21, p. 43-47, 1981.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.
- CAMPOS, P. S.; QUARTIN, V.; RAMALHO, J. C.; NUNES, M. A. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 283-292, 2003.
- CATALÁ, A. Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the "Fluid Mosaic Model" to the "Lipid Whisker Model". **Biochimie**, v. 94, p. 101-109, 2012.
- CARMO-SILVA, A. E.; GORE, M. A.; ANDRADE-SANCHEZ, P.; FRENCH, A. N.; HUNSAKER, D. J.; SALVUCCI, M. E. Decreased CO<sub>2</sub> availability and inactivation of Rubisco limit photosynthesis in cotton plants under heat and drought stress in the field. **Environmental and Experimental Botany**, v. 83, p. 1-11, 2012.
- CAVALCANTI, F. R.; OLIVEIRA, J. T. A.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist**, v. 163, p. 563-571, 2004.
- CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; CARVALHO, C. P. S.; SILVEIRA, J. A. G.; OLIVEIRA, J. T. A. An aqueous suspension of *Crinipellis pernicios*a mycelium activates tomato defence responses against *Xanthomonas vesicatoria*. **Crop Protection**, v. 26, p. 729-738, 2007.
- CAVALCANTI, F. R.; MONTEIRO, J. E. B. A.; ALMANÇA, M. A. K.; HUNOFF, T. S.; RUSIN, C. **Thermal Pest Control (TPC) II: aspectos gerais do efeito biológico do fluxo de ar quente na proteção da videira contra o míldio**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2014. 20 p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 100).
- CONRATH, U. Molecular aspects of defence priming. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 10, p. 524-531, 2011.
- FISHER, M.; DAWSON, A. **Thermal plant treatment and a machine to apply the treatment**. Int. A01G13/08. WO 2013147962 A1. 24 mar. 2012.
- FLEXAS, J.; GÁLMÉS, J.; GALLÉ, A.; GULÍAS, A.; POU, M.; RIBAS-CARBO, M.; TOMÁS, M.; MEDRANO, H. Improving water use efficiency in grapevines: potential physiological targets for biotechnological improvement. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 16, p.106-121, 2010.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.
- GLOBO RURAL. **Nova tecnologia promete cultivo de uvas sem agrotóxico**. 13 jan. 2011. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/Revista/Common/0,,EMI202267-18078,00-NOVA+TECNOLOGIA+PROMETE+CULTIVO+DE+UVAS+SEM+AGROTOXICO.html>> Acesso em: 27 jul. 2014.
- HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.
- HENDRICKSON, L.; BALL, M. C.; WOOD, J. T.; CHOW, W. S.; FURBANK, R. T. Low temperature

effects on photosynthesis and growth of grapevine. **Plant, Cell and Environment**, v. 27, p. 795-809, 2004.

KISSOUDIS, C.; de WIEL, C. V.; VISSER, G. F.; LINDEN, G. V. D. Enhancing crop resilience to combined abiotic and biotic stress through the dissection of physiological and molecular crosstalk. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1-20, 2014.

KNUDSON, L. L.; TIBBITS, T. W.; EDWARDS, G. E. Measurements of ozone injury by determination of leaf chlorophyll concentration. **Plant Physiology**, v. 60, n. 4, p. 606-608, 1977.

KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant Cell Physiology**, v. 34, n. 5, p. 713-721, 1993.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; BREUSEGEM, F.V. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 10, p. 490-498, 2004.

MONTEIRO, J. E. B. A.; CAVALCANTI, F. R.; FINGER, G.; DULLIUS, M. **Thermal Pest Control (TPC) I: caracterização do tratamento de fluxo de ar quente em vinhedo**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2014. 12 p. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 158).

SAGE, R. F.; KUBIEN, D. S. The temperature response of C3 and C4 photosynthesis. **Plant, Cell and Environment**, v. 30, p. 1086-1106, 2007.

SLAVIK, B. **Methods of studying plant water relations**. New York, Springer Verlag. 449 p. 1974.

SMIRNOFF, N. Botanical Briefing: the function and metabolism of ascorbic acid in plants. **Annals of Botany**, v. 78, n. 6, p. 661-669, 1996.

SUZUKI, N.; RIVERO, R. M.; SHULAEV, V.; BLUMWALD, E.; MITTLER, R. Abiotic and biotic stress combinations. **New Phytologist**, v. 203, n. 1, p. 32-43, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Sunderland: Sinauer, 2010. 782 p.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA H. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologia Plantarum**, v. 13, n. 1, p. 43-50, 1991.

VAN ROSSUN, M. W. P. C.; ALBERDA, M.; VAN DER PLAS, L. H. W. Role of oxidative damage in tulip bulb scale micropropagation. **Plant Science**, v. 130, n. 2, p. 207-216, 1997.

WIDIASTUTI, A.; YOSHINO, M.; HARUFUMI, S.; MAEJIMA, K.; ZHOU, S.; ODANI, H.; HASEGAWA, M.; NITTA, Y.; SATO, T. Induction of disease resistance against *Botrytis cinerea* by heat shock treatment in melon (*Cucumis melo* L.). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 75, p. 157-162, 2011.

WIDIASTUTI, A.; YOSHINO, M.; SAITO, H.; MAEJIMA, K.; ZHOU, S.; ODANI, H.; NARISAWA, K.; HASEGAWA, M.; NITTA, Y.; SATO, T. Heat shock-induced resistance in strawberry against crown rot fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 84, p. 86-91, 2013.

YAMORI, W.; HIKOSAKA, K.; WAY, D. A. Temperature response of photosynthesis in C3, C4 and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation. **Photosynthesis Research**, v. 119, p. 101-117, 2014.

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 247-273, 2002.

ZHU, Y.; QIAN, W.; HUA, J. Temperature modulates plant defense responses through NB-LRR proteins. **PLOS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. 1-12, 2010.





**Comunicado  
Técnico, 165**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
Embrapa Uva e Vinho  
Rua Livramento, 515 - Caixa Postal 130  
95700-000 Bento Gonçalves, RS  
Fone: (0xx) 54 3455-8000  
Fax: (0xx) 54 3451-2792  
<https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/>

1ª edição

1ª impressão (2014): 250 exemplares

**Comitê de  
Publicações**

Presidente: *César Luis Girardi*  
Secretária-Executiva: *Sandra de Souza Sebben*  
Membros: *Adeliano Cargnin, Alexandre Hoffmann,  
Ana Beatriz da Costa Czermainski, Henrique  
Pessoa dos Santos, João Caetano Fioravanço,  
João Henrique Ribeiro Figueredo, Jorge Tonietto,  
Luisa Veras de Sandes Guimarães e Viviane Maria  
Zanella Bello Fialho*

**Expediente**

Editoração gráfica: *Alessandra Russi*  
Normalização bibliográfica: *Luisa V. de S. Guimarães*